

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИТЕЛ, НЕ СВЯЗАННАЯ С АКТИВАЦИЕЙ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

*Огрызко Н.Н., Генералова А.Г., Генералов И.И.
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Собственная каталитическая (или абзимная) активность иммуноглобулинов (ИГ) и антител (АТ) по-прежнему остается предметом активного изучения исследователей, работающих в области биокатализа, иммунологии, биохимии, клинической медицины. В экспериментах на моноклональных антителах показано, что абзимы могут катализировать подавляющее большинство химических реакций. Сходные данные получены и для поликлональных АТ, которые в условиях *in vivo* проявляют самую разнообразную каталитическую активность (оксидоредуктазную, гиалуронидазную, нуклеазную, протеазную, амилазную и др.)

Вызывает очевидный интерес расширение спектра реакций, катализируемых поликлональными абзимами с учетом их возможного участия в патогенезе ряда заболеваний. Здесь следует остановиться на возможной цитотоксической и цитолитической активности поликлональных АТ. Matsuura с

соавт. показали, что абзимы-нуклеазы, попадая в ядро клеток-мишеней, приводят их к гибели. По мнению авторов, это может быть связано с активацией апоптоза под влиянием абзимов [1]. Тем не менее, прямого повреждающего действия абзимов на мембраны клеток пока продемонстрировано не было. Однако имеются единичные указания на то, что в определенных условиях ИГ способны повреждать мембраны клеток без участия комплемента. Так, Salama с соавт. в 1988 году описали явление лизиса эритроцитов под действием ИГ у больных анемией, вызванной холодовыми агглютинидами, без участия комплемента в этом процессе [2]. В настоящем исследовании мы предположили, что при индукции АТ, специфичных к поверхностным АГ эритроцитов, по крайней мере, часть из них способна проявлять собственную прямую цитолитическую активность. Данная гипотеза была проверена на модели взаимодействия кроличьих ИГ, выделенных из гипериммунной гемолитической сыворотки, с эритроцитами барана (ЭБ) в качестве клеток-мишеней.

Цель. Доказать наличие собственной гемолитической комплемент-независимой активности у противозритроцитарных АТ.

Материал и методы исследования. Взвесь ЭБ была любезно предоставлена сотрудниками иммунологической лаборатории Витебской областной клинической больницы. Фракция ИГ класса G была получена из гемолитической сыворотки производства РНИИЭМ им. Гамалеи методом аффинной хроматографии на агарозе, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка. Хранили препараты иммуноглобулинов в пластиковых пробирках в морозильнике при -20°C .

Для подтверждения специфической активности полученных после очистки гемолитических антител, проводили реакцию гемагглютинации в планшете для микротитрования. Использовалась 2% взвесь ЭБ и препарат очищенных IgG в двукратных разведениях. Контролем служил 0,15 М раствор NaCl и 2% взвесь ЭБ. В лунки вносили по 100 мкл каждого компонента, общий объем в каждой лунке составил 200 мкл. Пробы помешали на 20 часов инкубации в термостат при 37°C .

Для определения прямого повреждающего действия гемолитических антител на эритроциты проводили реакцию гемолиза без участия комплемента. Опытные пробы включали 0,15 мл pH 7,4, 0,02М Трис-буфера, 0,3 мл гемолитических антител (концентрация – 2 мг/мл) и 0,15 мл взвеси ЭБ. Для удаления компонентов комплемента, которые потенциально могли быть адсорбированы на эритроцитах, последние пять раз промывали физиологическим раствором. В контрольных пробах вместо антител использовали 0,3 мл изотонического раствора хлорида натрия. Постановка опыта проводилась в центрифужных пробирках. Инкубацию проводили в термостате при 37°C в течение 20 часов. По окончании инкубации пробы центрифугировали 1500 об/мин в течение 10 мин. Далее из каждого образца отбирали 0,2 мл содержимого и фотометрировали в планшетном фотометре АИФ М/340 пр-ва РУП «Витязь» (одноволновое измерение – методика №1, 405 нм – или двухволновое измерение – методика №20 при 405 нм и 570 нм).

Дополнительные контрольные эксперименты включали аналогичное взаимодействие ЭБ с неиммунными иммуноглобулинами, выделенными по такой же методике. Кроме того, для окончательного исключения возможной активности следовых количеств комплемента, потенциально сорбированных на ЭБ, эритроциты прогревали при 56°C в течение 30 мин, далее многократно отмывали

0,15 М раствором NaCl для удаления гемолизированных нагреванием клеток и инкубировали с АТ как описано выше.

Результаты исследования. По результатам реакции гемагглютинации оказалось, что выделенные IgG до титра 1/128 способны вызывать агглютинацию взвеси ЭБ. Это подтверждает достаточно высокую специфическую активность полученного препарата ИГ. По данным основного эксперимента (методика №20) было обнаружено, что оптическая плотность контрольных проб после инкубации составляет $0,105 \pm 0,002$ ед.; в свою очередь, оптическая плотность опытных проб составила $1,836 \pm 0,012$ ед. Этот результат доказывает, что иммунные IgG в отсутствие комплемента действительно способны производить гемолиз. Специфические АТ более чем в 15 раз усилили гемолиз эритроцитов в сравнении с реакцией спонтанного гемолиза контролей (хотя полного разрушения 2% взвеси эритроцитов в опытных пробах не происходило).

Неиммунные АТ в той же концентрации в произведенных контрольных экспериментах оказались неспособными к усилению гемолиза – оптическая плотность опытных проб превышала контрольные значения лишь на 10-15%. Это подтверждает специфичность действия иммунных АТ в реакции комплемент-независимого гемолиза.

Наконец, гемолиз под действием АТ интактных и прогретых при 56°C ЭБ был сходным. Это дает дополнительное подтверждение тому, что данная реакция не зависит от участия комплемента.

Полученные результаты указывают на возможность комплемент-независимого разрушения клеточных мембран под влиянием специфических АТ. Пока остается открытым вопрос о механизмах обнаруженной реакции. Природные токсины разрушают мембраны клеток двумя основными способами – либо они образуют канал в мембране клетки-мишени, либо проявляют цитолитическую ферментативную активность, в первую очередь – фосфолипазную. Первый вариант представляется для АТ маловероятным, поскольку требует образования надмолекулярного кластера из нескольких молекул ИГ, экспонирования на его поверхности гидрофобных участков с последующим погружением в мембрану клетки. В свою очередь, обнаружение у иммунных АТ абзимной активности, гидролизующей мембрану, представляется вполне возможным – ранее было показано, что при иммунизации антигенами самой разной природы среди поликлональных АТ образуются фракции с каталитической активностью.

При окончательном установлении абзимной природы цитотоксической активности иммунных АТ открываются новые перспективы изучения патогенеза многих заболеваний, протекающих по цитолитическому механизму (аутоиммунных анемий, агранулоцитоза, тромбоцитопений, системных васкулитов и др.)

Вывод. Фракции противозритроцитарных АТ могут проявлять собственную гемолитическую активность, независимую от комплемента.

Литература.

1. Matsuura K., Ikoma S., Watanabe M. et.al. Some Bence-Jones proteins enter cultured renal tubular cells, reach nuclei and induce cell death. // Immunol. -1999.-Vol.98, N4.-P.584-589
2. Salama I., Gottsche B., Vaidya V. et al. Complement-independent lysis of human red blood cells by cold hemagglutinins. //Vox Sang –1988 –Vol.55.–P 21–25.